

Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim Lipolitik pada Sumber Air Panas Lemo Susu, Pinrang, Sulawesi Selatan

Isran Asnawi^{*1)}, Hasnah Natsir¹⁾, and Nunuk Hariani¹⁾

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Tamalanrea, Makassar, South Sulawesi, Indonesia 90245

*Email : izran.asnawi@gmail.com

Abstrak

Lipase (EC 3.1.1.3) is one of a class of hydrolase enzymes that can hydrolyze triglycerides into fatty acids and glycerol. This study aims to explore the lipolytic enzyme-producing microbes from hot springs Lemo Susu, Pinrang South Sulawesi, by identify microbes generated and determine the optimum time conditions of enzyme production. Production is done by growing microbes on the substrate medium olive oil. Produced lipase activity was tested by titrimetric method. The results obtained showed that the microbial isolates from hot springs Lemo Susu Pinrang, has identified as Bacillus sp. LS3B and Bacillus sp. LS4B. The optimum conditions of production lipolytic Bacillus sp. LS3B and Bacillus sp. LS4B are obtained at fermentation time of 48 hours with successive activity of 0,5310 U/mL and 1,3171 U mL with an optimum temperature of 45 °C and optimum pH 7.

Keywords: Bacillus sp., Olive Oil, Lipase, Enzymes, Lipolytic

PENDAHULUAN

Industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat yang semakin tinggi terhadap lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Falch, 1991). Menurut WHO, Indonesia termasuk salah satu negara dengan sumber daya alam yang melimpah untuk penggunaan produksi berbagai bahan kimia dasar dan enzim.

Enzim pada umumnya dihasilkan dari makhluk hidup, baik dari hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme. Enzim yang berasal dari tumbuhan dan hewan memiliki banyak permasalahan. Permasalahan tersebut meliputi variasi musim, konsentrasi rendah, dan biaya proses yang tinggi, serta persediaan yang terbatas (Godfrey dan Reichelt, 1983). Menurut Smith (1985), permasalahan tersebut memberikan persoalan baru untuk pemenuhan persyaratan kebutuhan enzim masa kini dan masa yang akan datang. Oleh karena itu, peningkatan sumber enzim yang banyak dilakukan saat ini adalah isolasi enzim dari mikroba.

Keuntungan enzim yang diperoleh dari mikroba, antara lain penggunaan enzim yang lebih mudah, aktivitas serta peningkatan spesifikasi katalisis yang dapat diatur, produksi tidak memerlukan teknik penghancuran sel yang mahal dan rumit, serta berada dalam bentuk yang relatif murni pada biakan cair.

Salah satu enzim yang mempunyai peranan penting dalam perkembangan bioteknologi adalah lipase. Enzim lipase memiliki cakupan aplikasi yang luas dalam bidang bioteknologi seperti produksi pestisida, pengolahan limbah, industri makanan (pembuatan roti dan keju), biosensor, detergen, industri kulit, pembuatan kertas, dan industri oleokimia (Handayani dkk., 2006).

Aplikasi enzim dalam bioteknologi semakin menuntut agar dihasilkan produk berupa enzim yang bersifat tahan lingkungan. Faktor utama yang paling merusak enzim adalah suhu, sehingga usaha yang dapat dilakukan adalah produksi enzim termostabil dari mikroba termofilik. Mikroba termofilik adalah mikroba yang dapat bertahan hidup pada suhu 40 - 80 °C (Pelczar, 1986). Salah satu sumber alam yang berpotensi memiliki mikroba termofilik penghasil enzim adalah sumber air panas (Smith, 1985).

Daerah Sulawesi Selatan juga banyak memiliki potensi sumber air panas, salah satunya adalah permandian air panas Lemo Susu yang terletak di kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan. Maka dari itu dilakukan penelitian tentang eksplorasi mikroba lipolitik pada sumber air panas Lemo Susu, Pinrang, Sulawesi Selatan.

BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel air panas, yeast ekstrak, bakto agar, NaCl, bakto pepton, minyak zaitun (*olive oil*), KH₂PO₄,

MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, Rhodamin B, akuades, alkohol 70%, spiritus, buffer sitrat, buffer fosfat (NaH₂PO₄ dan Na₂HPO₄), fenoltalein 1%, NaOH 0,03 N, dan aseton.

Tahapan penelitian terdiri dari isolasi dan pemurnian mikroba lipolitik, karakterisasi mikroba penghasil enzim lipolitik, penentuan waktu produksi optimum enzim lipolitik, produksi enzim lipolitik, uji aktivitas enzim lipolitik, pengukuran kadar protein enzim, dan penentuan suhu dan pH optimum enzim lipolitik.

2.2 Isolasi dan Pemurnian Mikroba Penghasil Enzim Lipolitik

Sampel air dituang pada permukaan media pengayaan (*yeast* ekstrak 0,1%, NaCl 0,1%, pepton 0,1%) dan dikocok menggunakan *shaker* selama 24 jam. Setelah itu diinokulasikan sebanyak 200 µL ke dalam cawan petri berisi media padat pertumbuhan (*yeast* ekstrak 0,05%, NaCl 0,1%, pepton 0,01%, bakto agar 1,5%) dan dinkubasi selama 1 - 2 hari pada suhu 40 °C.

Koloni mikroba yang tumbuh diambil dan digores ke dalam media suplemen (*yeast* ekstrak 0,1%, NaCl 0,1%, bakto agar 1,5%, pepton 0,1%, KH₂PO₄ 0,01%, MgSO₄·7H₂O 0,01%, CaCl₂ 0,01%), dan diinkubasi selama 1 - 2 hari pada suhu 40 °C. Isolasi dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh isolat tunggal (kultur murni) untuk masing-masing koloni pada media suplemen.

Setelah diperoleh isolat tunggal dari berbagai koloni yang diperoleh, maka koloni mikroba yang telah murni diambil dan digores ke dalam media substrat yang mengandung minyak zaitun. Media substrat yang telah digores diinkubasi selama 1 - 2 hari pada suhu 40 °C. Indikasi bahwa bakteri dapat mendegradasi minyak zaitun ditunjukkan melalui isolat yang tumbuh dengan baik dan terbentuknya kompleks warna orange sekitar koloni pada media substrat dengan rhodamin B.

2.3 Karakterisasi Mikroba Penghasil Enzim Lipolitik

Isolat mikroba penghasil enzim lipolitik yang telah dimurnikan pada media substrat dikarakterisasi morfologinya dengan melakukan beberapa pengamatan pada morfologi isolat. Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan secara mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia sederhana.

2.4 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Lipolitik.

Isolat mikroba yang telah murni disuspensikan ke dalam media inokulum sebanyak 2 - 3 ose dan diinkubasi pada *shaker incubator* suhu 40 °C selama 18 - 24 jam dengan kecepatan agitasi 200 rpm. Selanjutnya sebanyak

10% diinokulasikan ke dalam media fermentasi dan diinkubasi selama 1 - 5 hari. Setiap 12 jam dilakukan *sampling* untuk penentuan kondisi optimum produksi berupa pengamatan pertumbuhan mikroba (DO).

2.5 Produksi Enzim Lipolitik

Setelah kondisi optimum diketahui, maka dilakukan produksi enzim dalam skala besar sekitar 500 mL. Media produksi disentrifugasi untuk pemisahan filtrat dan sel dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Filtrat merupakan enzim ekstrak kasar, selanjutnya dilakukan analisa kadar protein dengan metode Lowry, pengujian aktivitas lipolitik, dan penentuan suhu serta pH optimum.

2.6 Uji Aktivitas Enzim Lipolitik

Aktivitas enzim lipolitik ditentukan dengan menggunakan metode Lindfield dkk., (1984). Sebanyak 2 mL minyak zaitun dipipet ke dalam labu Erlenmeyer. Setelah itu ditambahkan 1 mL larutan enzim ekstrak kasar dan 4 mL larutan buffer fosfat pH 7,5. Campuran diinkubasi pada suhu 40 °C selama 1 jam. Selanjutnya ditambahkan 10 mL aseton-alkohol (1 : 1) dan diaduk hingga homogen. Larutan ditambahkan 2 - 3 tetes indikator pp (*phenolphthalein*) dan dititrasi dengan menggunakan KOH 0,05 N hingga warna larutan menjadi merah jambu dan tidak hilang. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama dengan sampel, tetapi larutan aseton-alkohol (1 : 1) ditambahkan pada jam ke-0. Aktivitas lipolitik dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas lipolitik (U/mL)} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{VE \times 60}$$

Keterangan :

A = mL KOH untuk titrasi sampel

B = mL KOH untuk titrasi blanko

1000 = konversi dari mmol ke µmol

VE = volume enzim

60 = waktu reaksi (1 jam = 60 menit)

Satu unit (U) aktivitas enzim setara dengan 1 µmol asam lemak bebas yang dihasilkan selama satu menit pada kondisi optimumnya.

2.7 Penentuan Kadar Protein

Sebanyak 1 mL larutan sampel (enzim lipolitik ekstrak kasar), 1 mL larutan standar, dan 1 mL akuades sebagai blanko masing-masing ditambahkan 2,75 mL reagen lowry B lalu campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 10-15 menit. Campuran kemudian ditambahkan 0,25 mL reagen lowry A, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbannya diukur pada panjang gelombang maksimum.

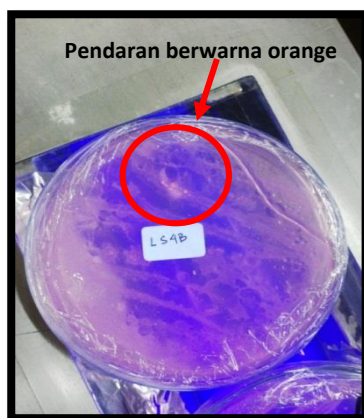
2.8 Penentuan Suhu dan pH Optimum

Ekstrak kasar enzim lipolitik ditentukan suhu dan pH optimumnya dengan cara menginkubasi campuran (enzim : substrat : buffer) pada berbagai variasi suhu dan variasi pH. Campuran 1 mL enzim, 1 mL substrat dan 1 mL buffer fosfat pH 7,0 diinkubasi selama 60 menit pada variasi suhu 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, dan 60 °C. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas lipolitik pada setiap variasi suhu sehingga diperoleh aktivitas lipolitik optimum pada suhu tertentu. Penentuan pH optimum dilakukan dengan hal yang sama pada variasi pH, yaitu pH 4, 5, 6, 7, dan 8 kemudian diinkubasi pada suhu optimum. dan dilakukan pengujian aktivitas lipolitik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikroba Penghasil Enzim Lipolitik

Isolasi mikroba penghasil enzim lipolitik yang dilakukan pada media substrat minyak zaitun, menghasilkan dua jenis isolat dengan pertumbuhan yang baik, yakni isolat LS3B dan LS4B. Hal ini karena isolat tersebut mampu beradaptasi dengan lingkungan tempat tumbuhnya. Dua jenis isolat ini kemudian dilanjutkan pengamatan uji kualitatif enzim lipolitik yang ditumbuhkan pada media substrat mengandung Rhodamin B. Hasil pengamatan menunjukkan adanya pendaran berwarna orange di sekitar koloni mikroba yang disinari lampu UV (Gambar 1). Pendaran tersebut terbentuk oleh suatu kompleks antara ion asam lemak yang dihasilkan pada reaksi hidrolisis enzimatis oleh lipase dengan kation Rhodamin B (Kouker dan Jaeger, 1987). Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut mampu menghasilkan lipase.



Gambar 1. Hasil Pengamatan Uji Kualitatif Mikroba Penghasil Lipolitik di bawah sinar UV

Hasil pengamatan makroskopis isolat murni LS3B dan LS4B menunjukkan karakter dan

ciri-ciri yang sama dengan jenis bakteri. Isolat LS3B dan LS4B memiliki koloni yang bulat, tepian berombak, pertumbuhannya menyebar, kecil, dan tipis. Sedangkan secara mikroskopis, mikroba LS3B dan LS4B menunjukkan bahwa isolat ini merupakan bakteri gram positif karena menghasilkan warna biru keunguan setelah ditetesi larutan lugol. Isolat LS3B dan LS4B merupakan bakteri yang berbentuk basil dan memiliki spora yang membuat mikroba ini dapat tahan pada lingkungan yang ekstrim seperti suhu yang. Hal ini diamati pada mikroskop dengan pembesaran 1000x.

Hasil uji biokimia sederhana terhadap dua isolat menunjukkan hasil positif pada uji metil merah dan katalase. Uji metil merah untuk kedua isolat memperlihatkan hasil positif yang mengindikasikan bahwa bakteri tersebut menghasilkan asam. Adanya perubahan warna pada media dari warna merah kecoklatan menjadi warna kuning menunjukkan bahwa isolat merupakan bakteri yang memproduksi asam. Selanjutnya uji katalase menunjukkan hasil positif yang mengindikasikan bahwa terdapat enzim katalase yang dihasilkan oleh suatu bakteri untuk memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Hasil positif dari uji katalase ditandai dengan adanya gelembung gas O_2 .

Berdasarkan hasil karakteristik morfologi dan biokimia sederhana isolat mikroba penghasil lipolitik dari sumber air panas Lemo Susu, Pinrang, Sulawesi Selatan diketahui bahwa isolat tersebut memiliki ciri-ciri yang mengarah pada bakteri genus *Bacillus* sp. Oleh karena itu isolat tersebut dinyatakan sebagai isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B.

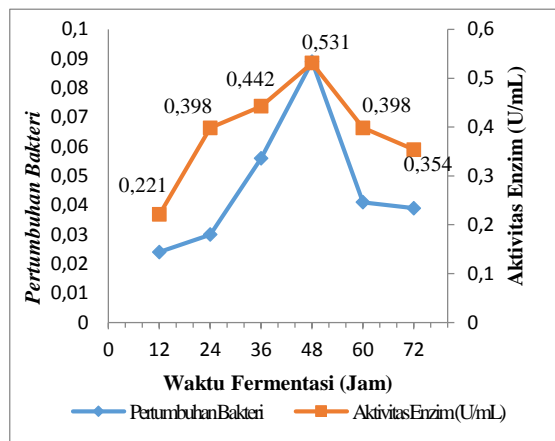
Pertumbuhan Mikroba dan Aktivitas Enzim Lipolitik

Data pengamatan pertumbuhan bakteri diukur menggunakan spektrofotometri UV/VIS pada panjang gelombang 660 nm (*optical density*). Data hasil penelitian kurva pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 2a dan 2b.

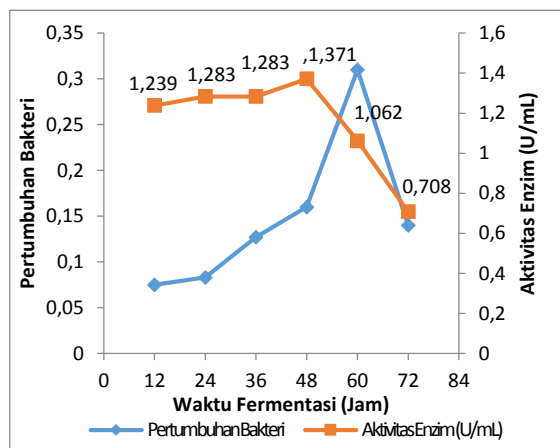
Isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B mengalami pertumbuhan dan perkembangbiakan sel dalam memproduksi enzim lipolitik hingga mencapai puncaknya pada suatu waktu tertentu dan setelah itu pertumbuhannya akan mengalami penurunan. Dari Gambar 2a dan 2b, data pertumbuhan bakteri memperlihatkan bahwa produksi enzim lipolitik dari isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B mengikuti pola kurva pertumbuhan bakteri, namun fase stasioner berlangsung lebih cepat daripada kondisi yang seharusnya.

Ekstrak kasar enzim lipolitik diukur aktivitasnya dengan metode titrimetri (Linfield,

dkk., 1984). Aktivitas enzim lipolitik ditunjukkan dengan perubahan warna saat titrasi dengan indikator PP dari tidak berwarna menjadi berwarna merah muda akibat terjadinya perubahan pH pada larutan. Warna merah muda muncul saat NaOH tidak lagi dapat berikatan dengan asam lemak, sehingga memberikan sifat basa pada larutan dan menimbulkan warna merah muda sebagai indikasi perubahan pH larutan (Paskevicius, 2001, dalam Asih, 2011).



(a)



(b)

Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Enzim Lipolitik (a) isolat *Bacillus sp.* LS3B ; (b) isolat *Bacillus sp.* LS4B

Data hasil penelitian (Gambar 2a dan 2b) menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipolitik isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B terbesar berada pada jam ke-48. Hasil pengujian aktivitas enzim lipolitik pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan aktivitas dengan bertambahnya waktu fermentasi. Nilai aktivitas enzim pada waktu fermentasi optimum yaitu jam ke-48 dari isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B berturut-turut adalah 0,531 U/mL dan 1,3175 U/mL. Setelah aktivitas

optimum tercapai, terjadi penurunan aktivitas. Hal ini terjadi karena semakin berkurangnya kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim lipolitik sehingga minyak zaitun yang terhidrolisis menjadi asam lemak berkurang. Selain itu, menurunnya aktivitas enzim juga disebabkan berkurangnya jumlah substrat atau jumlah produk enzim yang menghambat pembentukan kompleks enzim substrat (Hasnunidah dan Sumardi, 2009).

Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 2a dan 2b, dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim yang tertinggi dapat dihasilkan pada saat bakteri mengalami fase eksponensial yaitu pada jam ke-48.

Pengukuran Kadar Enzim Lipolitik

Hasil pengukuran kadar protein tertinggi dari isolat *Bacillus sp.* LS3B terdapat pada jam ke-72 sebesar 5,1238 mg/mL sedangkan untuk isolat *Bacillus sp.* LS4B kadar protein tertinggi terdapat pada jam ke-60 sebesar 2,4266 mg/mL. Kadar protein yang tinggi tidak mutlak menunjukkan kadar enzim yang tinggi pula. Untuk mengetahui protein tersebut sebagai lipase, aktivitas enzim perlu diketahui. Gambar 3a dan 3b menunjukkan perbandingan kadar protein dan aktivitas enzim untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim.

Aktivitas tertinggi enzim lipolitik dari isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B berturut-turut terdapat pada jam ke-48 sebesar 0,5310 U/mL dan 1,3717 U/mL. Hubungan antara aktivitas lipase dan protein yang dihasilkan dinyatakan dengan aktivitas spesifik. Semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka semakin tinggi kemurnian enzim tersebut (Yuneta dan Putra, 2010). Aktivitas spesifik tertinggi isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B berturut-turut berada pada jam ke-48 sebesar 0,2581 U/mg dan 0,7251 U/mg, sehingga penentuan waktu produksi optimum enzim lipolitik dapat mengacu pada waktu fermentasi tersebut.

Penentuan Suhu dan pH Optimum Enzim Lipolitik

Data hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim lipolitik untuk isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B terus meningkat hingga mencapai suhu optimum 45 °C dengan aktivitas berturut-turut sebesar 0,8407 U/mL dan 0,8850 U/mL (Gambar 3a).

Hal itu disebabkan karena seiring meningkatnya temperatur, energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi bertambah sehingga molekul yang bereaksi semakin banyak dan produk yang dihasilkan semakin besar. Enzim tersebut mengalami denaturasi protein yang merubah konformasi struktur molekul sehingga

Tabel 1. Data Aktivitas Spesifik Enzim Lipolitik Isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B

No.	Waktu Fermentasi (Jam)	LS3B			LS4B		
		Konsentrasi Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim Lipolitik (U/mL)	Aktivitas Spesifik Enzim (U/mg)	Konsentrasi Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim Lipolitik (U/mL)	Aktivitas Spesifik Enzim (U/mg)
1	12	2,1605	0,2212	0,1024	1,5963	1,2390	0,7761
2	24	2,2706	0,3982	0,1753	1,8953	1,2832	0,6670
3	36	2,0688	0,4425	0,2139	1,9220	1,2832	0,6676
4	48	2,0568	0,5310	0,2581	1,8915	1,3717	0,7252
5	60	2,9678	0,3982	0,1342	2,4266	1,0620	0,4376
6	72	5,1238	0,3540	0,0691	1,6788	0,7080	0,4217

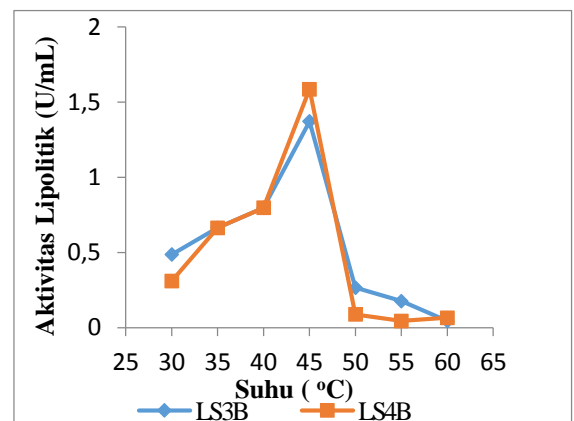
enzim kehilangan sifat alamiahnya. Pada temperatur tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989).

Data hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim lipolitik untuk isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B terus meningkat hingga mencapai pH optimum 7 dengan aktivitas berturut-turut sebesar 1,3275 U/mL dan 1,5045 U/mL.

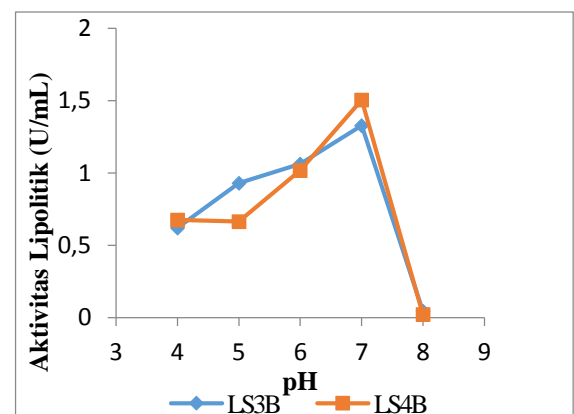
Suhu optimum yang diperoleh dari enzim lipolitik isolat bakteri *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B adalah 45 °C. Hasil ini didukung oleh Reetz, dkk. (2006) yang menyatakan bahwa kisaran suhu optimal lipase untuk mengkatalisis reaksi adalah antara 20-60 °C. Suhu optimum ini sesuai dengan hasil penelitian tentang karakterisasi enzim lipolitik dari mikroba *Bacillus subtilis* yang dilakukan oleh Yuneta dan Putra (2009) yang memperoleh suhu optimum 45 °C.

Menurut Putranto dkk (2006), kondisi lingkungan dimana enzim dapat mengkatalisis substrat pada pH optimum. pH yang jauh dari kondisi optimum menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim mengalami kerusakan struktur protein sehingga aktivitasnya berkurang dan bahkan menjadi tidak aktif (Gambar 3b).

Pengaruh pH terhadap aktivitas lipolitik telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya yang mengisolasi enzim lipase dari sumber air panas. Penelitian oleh Kamaruzaman (2008) yang menunjukkan bahwa enzim lipolitik memiliki aktivitas optimum pada pH 7 yaitu sebesar 4,58 U/mL. Penelitian yang dilakukan oleh Asih (2011), memperoleh pH optimum 7



(a)



(b)

Gambar 3. (a) Pengaruh suhu dan (b) pH terhadap aktivitas lipolitik dari isolat *Bacillus* sp. LS3B dan *Bacillus* sp. LS4B

sebesar 5,9593 U/mL. Penelitian oleh Rohmatillah (2012), yang mengisolasi enzim lipase dari sumber air panas Cangar, Malang

memiliki pH optimum 7 dengan aktivitas sebesar 0,16 U/mL. Beberapa hasil penelitian tersebut tidak jauh berbeda dengan pH optimum dan aktivitas enzim yang diperoleh dari penelitian ini.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan :

1. Karakteristik mikroba penghasil enzim lipolitik sumber air panas Lemo Susu, Pinrang, Sulawesi Selatan teridentifikasi sebagai isolat *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B.
2. Kondisi optimum produksi enzim lipolitik dari *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B diperoleh pada waktu fermentasi 48 jam dan suhu 40 °C dengan aktivitas berturut-turut sebesar 0,5310 U/mL dan 1,3171 U/mL.
3. Suhu dan pH optimum enzim lipolitik yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus sp.* LS3B dan *Bacillus sp.* LS4B adalah 45 °C dan pH 7.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani S, M.S atas bimbingan, waktu, dan sumbangsih pemikiran selama penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Asih, S., 2011, *Karakterisasi enzim hidrolase bakteri dari mata air soda Parbubu, Tapanuli Utara*, Skripsi tidak diterbitkan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Aunstrup, K.O., Andressen, Falch, dan Nielsen, 1979, *Production of Microbial Enzymes, Microbial Technology*, Academic Press Inc., New York.
- Falch, E.A., 1991, *Industrial Enzymes Developments in Production and Application*, *Biotech Adv*, 9(2), 643-658.
- Godfrey, T. dan Reichelt, J., 1983, *Industrial Enzymology : The Application of Enzymes in Industry*, Macmillan, London.
- Handayani, S., Sugiharni, N., Hernawati, B.D., dan Hudiyono, P.W.S., 2006, *Studi Pendahuluan Poliester Sukrosa dari Asam Lemak Minyak Sawit dan Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Enzim Lipase yang Diproduksi oleh Pseudomonas aeruginosa dan Pseudomonas fluorescens*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hasnunidah, N., dan Sumardi, 2009, *Isolasi Bacillus sp. Penghasil Lipase dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Biologi FMIPA, Unila, Lampung.
- Kamaruzaman, A.L., 2008, *Identification of Lipase-Producing Thermophilic Bacteria Isolated From Hot Springs in Malaysia*, Thesis not be published, Universiti Putra Malaysia, Malaysia.
- Linfield, W.M., Barauskas, R.A., Sivier, L., Serota, S., dan Stevenson, R.W., 1984, *Enzymatic Fat Hidrolysis and Synthesis*, *JAACS*, 61, 191-195.
- Macrae, A.R., 1983, *Extracellular Microbial Lipases In "Microbial Enzymes and Biotechnology"*, Applied Science Publiser Ltd., England.
- Paskevicius, A., 2001, *Lipase activity of yeast and yeasts-like fungi functioning under natural conditions*, *Institute Of Botany*, London.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 1986, *Elements of Microbiology*, Terjemahan oleh Ratna Siri Hadiutomo dkk., 2007, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D., dan Vogel, A., 2006, *Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability*, *Angew Chem International*, 45, 7745-7751.
- Rohmatillah, Y., 2012, *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Lipase Termotabil dari Sumber Air Panas Cangar Kota Batu Jawa Timur*, Skripsi tidak diterbitkan, Universitas Negeri Malang.
- Smith, J.E., 1985, *Biotechnology Principles*, Terjemahan oleh Usman F. Sumo dkk., 1990, PT. Gramedia, Jakarta.
- Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Yuneta, R., dan Putra, S.R., 2009, *Pengaruh Suhu pada Lipase dari Bakteri Bacillus subtilis*, Prosiding Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.